

学校编码:10384

学号:31420121150065

分类号_____密级_____

UDC_____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

富勒烯 C₆₀ 衍生物对斑马鱼胚胎的毒理学效
应及机制

Toxic effects C₆₀ fullerene derivatives on zebrafish embryos
and molecular mechanisms

陈 旻

指导教师姓名: 叶社房 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席:_____

评 阅 人:_____

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

纳米科技已经成为 21 世纪前沿科学技术的代表领域之一，纳米材料应用日益普遍。富勒烯及其衍生物又因为它们特有的物理化学性质，在各个领域,特别是在生物医药领域的应用越来越广泛，环境中暴露几率的提高使得富勒烯衍生物潜在的毒理学效应评价十分必要。本论文以斑马鱼为模式生物，研究不同功能基团修饰的富勒烯衍生物暴露下斑马鱼胚胎的毒性效应，并阐明了不同功能基团修饰的 C₆₀ 衍生物诱导斑马鱼胚胎毒性的机制较全面的评估了不同富勒烯衍生物的胚胎毒性，为今后合理设计具有较好生物相容性的富勒烯衍生物，拓展其生物学应用提供科学理论依据。主要研究内容和实验结果如下：

1. 合成了三种富勒烯衍生物：羟基 C₆₀ 衍生物，乙二胺 C₆₀ 衍生物和丙二酸 C₆₀ 衍生物。利用 FT-IR、MS、AFM、TEM 和 DLS 等表征手段对所制备的三种富勒烯衍生物进行表征。表征结果证明，三种富勒烯衍生物的分子式为：C₆₀(OH)₂₄、C₆₀-(HNCH₂CH₂NH₂)₁₄、C₆₀-(C(COOH)₂)₅，几种检测方法检测的三种富勒烯衍生物的粒径分别大约为：116 nm、79 nm、174 nm，并且在本次实验的对照组溶液（HBSS/DMSO，99：1）中具有良好的分散性和相对稳定性。
2. 对斑马鱼胚胎进行毒理暴露实验，在不同浓度（25、50、100、200 μg/mL）的三种富勒烯衍生物纳米粒子暴露下，观察对照组和实验组斑马鱼的胚胎致死率，胚胎孵化率，24 hpf 到 96 hpf 完整的胚胎畸形形态学，48、72 hpf 的畸形率和心脏跳动等毒理学指标。从暴露实验的结果来看，C₆₀-OH 纳米粒子胚胎毒性最低；其它两种富勒烯衍生物具有较显著的胚胎毒性，其中 C₆₀-NH₂ 的纳米毒性主要表现在抑制胚胎孵化的方面，而 C₆₀-COOH 纳米粒子的胚胎毒性最强，导致最高的斑马鱼胚胎致死率，并产生严重的形态学畸形和心率抑制。
3. 接着对富勒烯衍生物产生胚胎毒性的机制进行了初步研究，比较的指标有斑马鱼胚胎 ROS，细胞凋亡，酶活性，Hsp70、Bax 和 ZHE1 的 mRNA 表达。实验结果表明 C₆₀-NH₂ 纳米粒子引起的细胞凋亡主要发生在斑马鱼的尾部和头部，C₆₀-COOH 纳米粒子引起的凋亡主要发生在心包或卵黄囊处；ROS 积

摘要

累量的变化, SOD、CAT 活性的变化, 氧化应激、细胞凋亡、孵化相关的基因 mRNA 的变化, 表明三种富勒烯衍生物纳米粒子暴露下产生的氧化应激可能是导致其胚胎毒性效应的重要机制。

关键词: 斑马鱼; 富勒烯 C₆₀; 富勒烯衍生物; 胚胎毒性; 氧化应激; 孵化率

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nanotechnology has become one of the frontier of the science and technology in the 21st century, nanomaterials have exhibited a wide and increasing range of applications. The most extensively used nanoparticles among these engineered nanomaterials are fullerenes and its derivatives, due to their unique physical and chemical properties. The environmental exposure risk of fullerene derivatives makes their potential toxicological evaluation necessary. In the present study, we selected zebrafish as the model organism and studied embryotoxicity of three functionalized fullerene derivatives. It is comprehensive evaluation on the different fullerene derivatives embryotoxicity, and it also provides a new theoretical basis for preparation and toxicological evaluation of better biocompatibility of fullerene derivatives in the future. The main contents and results are as follows:

1. Polyhydroxylated fullerene derivatives, ethylenediamine fullerene derivatives and malonic acid fullerene derivatives were synthesized. The powders were characterized by FT-IR, MS, AFM, TEM and DLS. The chemical formula of the three fullerene derivatives were finally determined to be $C_{60}(OH)_{24}$, $C_{60}-(HNCH_2CH_2NH_2)_{14}$ and $C_{60}-(C(COOH)_2)_5$. The average diameters of three nanoparticles were 116 nm, 79 nm and 174 nm, respectively. Prepared fullerene derivatives are most stable in HBSS/DMSO.
2. For the zebrafish toxicological experiment, we chose four different concentrations of three fullerene derivatives (25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) and selected a sequence of assessable toxic endpoints including embryonic mortality, hatching rate, malformation and heart rate. The results showed that $C_{60}\text{-OH}$ nanoparticles were slight toxic to zebrafish embryos, positively charged $C_{60}\text{-NH}_2$ created the toxic effects mainly on the embryos hatching and $C_{60}\text{-COOH}$ nanoparticles presented the highest toxic effects on the embryos mortal and malformation.
3. Furthermore, we also studied the toxic mechanism of three fullerene derivatives exposure to zebrafish. We selected ROS generation, cell apoptosis, enzyme

Abstract

activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the gene expression of Hsp70、 Bax and ZHE1 as the measurement indicators. The results showed that C₆₀-NH₂ nanoparticles created the most increased apoptosis signal in the nervous system (tail and head) and C₆₀-COOH nanoparticles exposures had the severe cell death in the heart region. All the measurement results indicated that oxidative stress created by three fullerene derivatives exposure could be the important mechanism of their embryotoxicity.

Key Words: Zebrafish; C₆₀; fullerene derivatized nanoparticles; embryotoxicity; oxidative stress; hatching rate

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	III
Contents	V
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 富勒烯及其衍生物概述及应用	2
1.3 富勒烯及其衍生物的毒性效应及研究现状	5
1.4 斑马鱼及其在毒理学中的应用	8
1.5 本论文的技术路线和研究内容	11
参考文献	13
第二章 富勒烯衍生物的制备、表征及模式生物斑马鱼培育.....	19
2.1 引言	19
2.2 实验材料与仪器	21
2.3 实验方法	23
2.4 结果与讨论	29
2.5 本章小结	37
参考文献	38
第三章 富勒烯衍生物对斑马鱼胚胎的毒性效应.....	40
3.1 引言	40
3.2 实验材料	41
3.3 实验方法	43
3.4 结果与讨论	46
3.5 本章小结	62

参考文献	63
第四章 富勒烯衍生物对斑马鱼胚胎的毒性效应机制.....	67
4.1 引言	67
4.2 实验材料与仪器	68
4.3 实验方法	70
4.4 结果与讨论	76
4.5 本章小结	88
参考文献	90
第五章 全文总结和展望	93
5.1 总结	93
5.2 展望	94
硕士期间发表论文	95
致 谢.....	96

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Review	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Summary of fullerene and its derivatives and their applications.....	2
1.3 The toxic effect of fullerene and its derivatives and research status.....	5
1.4 Zebrafish and its application in toxicology.....	8
1.5 The proposal and contents of this study.....	11
References	13
Chapter 2 The preparation, characterization of fullerene derivatives and the cultivation of zebrafish model organisms	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Materials and instruments	21
2.3 Methods.....	23
2.4 Results and Discussion.....	29
2.5 Summary.....	37
References	38
Chapter 3 The toxic effects of fullerene derivatives on zebrafish embryos	40
3.1 Introduction.....	40
3.2 Materials	41
3.3 Methods.....	43
3.4 Results and Discussion.....	46

3.5 Summary.....	62
References.....	63
Chapter 4 The possible mechanism of embryotoxicity of fullerene derivatives.....	67
4.1 Introduction.....	67
4.2 Materials and instruments.....	68
4.3 Methods.....	70
4.4 Results and Discussion.....	76
4.5 Summary.....	88
References.....	90
Chapter 5 Conclusion and outlook.....	93
5.1 Conclusion.....	93
5.2 Outlook.....	94
Research achievements.....	95
Acknowledgements.....	96

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 引言

纳米 (nanometre, nm) 是一种长度单位, 是 1 mm 的百万分之一, 只相当于 10 个氢原子一个挨着一个排起来的长度。纳米材料是指其三维尺寸至少有一维小于 100 nm, 且在纳米尺度 (1-100 nm) 内通过调控物质的结构而制成具备特殊功能的新型材料, 是由纳米粒子组成的。在此基础上, 研究与制备以纳米材料为核心的物理学、化学、材料学、生物学、医学等领域的科学和技术的基本问题, 研究物质纳米结构的特性, 研究原子、分子及纳米结构单元之间的相互作用的科学与技术, 被成为纳米科技^[1]。

纳米科技的发展依赖于纳米材料, 可以说明纳米材料是纳米科技的基础与核心。纳米材料已是 21 世纪的主导技术, 并对未来社会 and 经济发展有重要影响, 世界上许多国家, 包括中国都非常重视纳米科技的研究, 增加纳米科技投入, 说明纳米材料已经成为全球科学技术研究的热点^[2]。正如某位美国科学家预料的, “这种肉眼看不见的极小的物质很可能给各个领域带来一场革命。” 不论如何, 按照现在的发展趋势, 纳米材料研究、应用和发展将对布局国民经济支柱产业、设计新产品及形成新产业及改造传统产业注入高科技元素, 提供新的机会^[3]。

1985 年, Kroto 等^[4]精确控制实验条件, 采用大功率激光器蒸发石墨, 产生的团簇发生碰撞, 在质谱仪上出现了原子量为 720 和 840 的特征峰, 同时得到了结构式为 C_{60} 和 C_{70} 的两种物质。 C_{60} 的立体模型与现代足球的拼皮样式完全类似, Kroto 等将 C_{60} 称为“足球烯”(footballene), 又由于 Fuller 发明的短程线圆顶结构可以解释 C_{60} 分子的稳定性, 故又将其命名为“富勒烯”(fullerene)^[5]。 C_{60} 的发现引领我们进入一个崭新的碳化学世界, 经过几十年的发展, 富勒烯及其衍生物对物理、化学、材料科学、生命及医药科学各领域已经有广泛地影响, 不但极大丰富和提高了科学理论体系, 而且显示出巨大的应用前景。

1.2 富勒烯及其衍生物概述及应用

1.2.1 富勒烯结构及其性质

所有纳米材料所具备的结构特点是纳米尺度的结构单元、大量界面或限域效应和各纳米单元之间存在强弱的交互作用。纳米材料由于其晶粒极小，表面积大，使其具有传统固体所不具备的许多特殊的基本性质，主要有量子尺寸效应、小尺寸效应、表面和界面效应、宏观量子隧道效应。富勒烯除了具有纳米材料共同的特点和基本性质外，其独特的结构又使其具备许多特殊的性质。

C_{60} 作为富勒烯家族的典型代表，其发现和发展在世界科学史长河中占有重要地位。富勒烯分子是由 12 个五边形和 20 个六边形组成的凸 32 面体，如图 1-1，分子直径 0.71 nm，有 5 个对称轴^[6]，其五边形仅由单键构成，而六边形则是由单、双键交替构成。

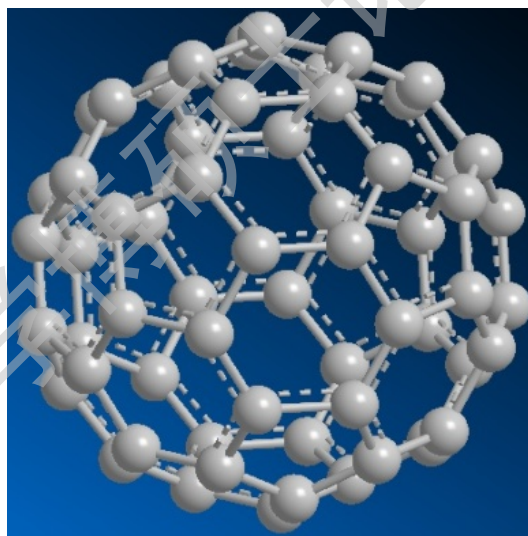


图 1-1 C_{60} 结构示意图

Figure 1-1 Structure diagram of C_{60}

球面弯曲效应和部分五元环结构使得 C_{60} 的碳原子的杂化方式不同于石墨晶体和金刚石，而是处于 sp^2 和 sp^3 杂化之间，这种特殊结构让富勒烯分子具有独特的特性，其主要物理特性归纳于表 1-2。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.